

# Mise en culture de mycoplasmes à partir de racines et d'inflorescences de cocotiers atteints par la maladie de Kaincopé

## *Culture of mycoplasma from the roots and inflorescences of coconut palms attacked by Kaincope disease*

J. GIANNOTTI (1), F. ARNAUD (2), M. DOLLET (2), R. DELATTRE (3), G. de TAFFIN (4)

(avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> CZARNECKY (1))

**Résumé.** — En 1932 est apparue sur cocotier à Kaincopé, au Togo, une maladie qui se propage lentement en tache d'huile. Les arbres atteints meurent 3 à 7 mois après l'apparition des premiers symptômes. Le mode de propagation de la maladie laisse supposer que l'agent causal ou vecteur est lié au sol.

L'étude des cultures réalisée à partir des extrémités de racines ou de jeunes inflorescences provenant d'arbres malades ou d'arbres sains prélevés dans une zone saine a mis en évidence des particules du type mycoplasme. De nouvelles recherches de caractère pratique sont prévues : localisation des germes, traitement aux antibiotiques, détermination des vecteurs, aire d'extension du mycoplasme, test de résistance de différents types de cocotier.

**Mots clés :** Cocotier, Maladie de Kaincopé, Mycoplasme, Antibiotiques, Vecteurs, Résistance.

**Summary.** — In 1932, at Kaincope in Togo, appeared a disease which spreads slowly like an oil stain. The trees attacked die 3 to 7 months after the appearance of the first symptoms. The way in which the disease spreads suggests that the causal agent or vector is linked with the soil.

The study of cultures made from the tips of roots or young inflorescences from diseased trees or from healthy trees in a disease-free zone, has brought to light particles of the mycoplasma type. New research of a practical nature is planned : localization of germs, antibiotic treatment, determination of vectors, range of extension of the mycoplasma, test of the resistance of different types of coconut.

### INTRODUCTION - GÉNÉRALITÉS

#### 1. Description et évolution des symptômes.

Une maladie de dépérissement du cocotier a été observée au Togo depuis de nombreuses années (1932) dans la zone Est, près du village de Kaincopé d'où elle tire son nom. Elle se caractérise par une chute anormale des noix. Ce sont d'abord les fruits âgés qui tombent après avoir présenté à leur base une zone d'abscission grisâtre ; progressivement les fruits de plus en plus jeunes se détachent du cocotier malade, et l'on observe souvent que seul un secteur de la plante présente cette anomalie, les autres zones restant provisoirement d'apparence saine. Les symptômes suivants affectent les feuilles ; d'abord celles en position basse commencent à jaunir, puis les jeunes feuilles ne peuvent développer un rachis normal, ce qui donne à la couronne un aspect plus touffu. Lorsque la maladie est à un stade bien prononcé, les feuilles de plus en plus jeunes se décolorent et prennent une

### INTRODUCTION - GENERAL

#### 1. Description and Evolution of Symptoms.

A wilting disease of the coconut has been observed in Togo for many years (since 1932), in the eastern region near the village of Kaincope, from which it gets its name. It is characterized by abnormal nut fall ; the old fruit fall first, after presenting a greyish absciss layer at their base, then younger and younger fruit fall from the diseased tree ; it is often observed that only part of the plant has this anomaly, the other parts remaining apparently healthy for the time being. The next symptoms to appear affect the leaves ; first the lower ones start to yellow, then the young leaves are unable to develop a normal rachis, which gives the crown a bushier appearance. When the disease has become pronounced, progressively younger leaves discolour and take on a rusty

(1) I. N. R. A., Station de recherches cytopathologiques, Saint-Christol-les-Alès.

(2) I. R. H. O., La Mé (Côte d'Ivoire).

(3) I. R. C. T., Paris.

(4) I. R. H. O., Pobé (Dahomey).



Fig 1. — Symptômes de la maladie de Kaincôpe en cours d'évolution.

Fig. 1. — *Symptoms of Kaincôpe disease developing.*

teinte rouille ; l'extrémité des inflorescences mûres brunit et se dessèche ; en écartant les spathes d'une jeune inflorescence, on y observe des taches brunâtres sur les épillets, et souvent aussi sur les fleurs. Enfin, le dépérissement se poursuit par une pourriture de la flèche, des très jeunes feuilles et du cœur. Le méristème périt et le système racinaire se désagrège. La mort survient, de 3 à 7 mois après les premiers symptômes correspondant à la chute anormale des noix, puis la couronne pourrit et tombe laissant des stipes décapités.

## 2. Epidémiologie de la maladie.

La zone contaminée est très strictement délimitée. Les premières observations remontent à 1932. A cette époque, seules les plantations du village de Kaincôpe présentaient des plants malades. Depuis, la maladie a progressé, des périodes de poussées rapides alternant avec des phases d'accalmie. La maladie se propage lentement en taches d'huile. Le processus d'extension de la zone atteinte évoque un mode de contamination excluant pratiquement la dispersion à longue distance par des vecteurs aériens. L'agent de la maladie semble ainsi assez strictement lié au sol. La gravité de la maladie est mesurée par ses incidences économiques puisque les exportations de coprah, qui étaient d'environ de 5 000 t par an entre 1950 et 1960 sont pratiquement nulles aujourd'hui.

*hue ; the tips of the mature inflorescences brown and dry up ; if the spathes of a young inflorescence are parted brownish patches can be seen on the spikelets and often on the flowers as well. Finally, wilting continues with rotting of the spear, the very young leaves and the bud. The meristem dies and the root system disintegrates. Death occurs 3 to 7 months after the appearance of the first symptoms corresponding to the abnormal nut fall, then the crown decays leaving the trunks headless.*

## 2. Epidemiology of the Disease.

*The area of contamination is strictly delimited. The first observations go back to 1932, and at that time only the plantations of the Kaincôpe village showed diseased palms. Since then the disease has made progress, periods of rapid upsurge alternating with lulls. It spreads slowly like oil stains, and the way in which the zone extends suggests a mode of contamination which practically rules out long-distance dispersal by aerial vectors. It seems, therefore, that the agent of the disease is strictly connected with the soil. The gravity of the disease can be measured by its economic effects, since copra exports, which were about 5 000 tons per annum between 1950 and 1960, are practically nil today.*



Fig. 2. — Evolution de la maladie de Kaincopé en taches.

Fig. 2. — A spreading patch of the disease.

## RECHERCHES ÉTIOLOGIQUES

La zone de culture de cette maladie est caractérisée par des sols de type sableux. Les analyses de sol de Lamouroux [6] n'ont fait apparaître aucune différence significative entre les zones saines et les zones malades. De même, les analyses de Bachy et Hoestra [1] portant sur les tissus de plantes malades et saines ne révèlent aucune différence significative. Les essais de fumure de ces mêmes auteurs ne sont pas non plus concluants. Par contre, ils remarquent que la maladie présente une périodicité dans son développement, ce qui autorise à admettre l'intervention d'un organisme vivant, causal ou vecteur, soumis au cycle saisonnier.

Le seul indice assuré étant une propagation de la maladie par le sol, deux voies différentes furent explorées.

La première concerne une relation possible avec des *Fusarium*, beaucoup d'entre eux étant fortement associés à des conditions de sol et certains provoquant des trachéomycoses qui déterminent des dépérissements plus ou moins rapides. Cependant, les travaux de Meiffren [8] n'ont pas permis de tirer une conclusion d'ordre étiologique à ce sujet.

La deuxième concerne un lien possible de la maladie avec des nématodes. Les travaux de Luc ont conduit à la découverte de trois espèces de nématodes phytoparasites présents dans les cocoteraies. Mais leur liaison plus ou moins permanente avec les zones de maladie de Kaincopé n'est pas concluante.

Récemment, les travaux ont repris sous une double impulsion. D'une part, il s'agit de l'observation de mycoplasmes dans des cocotiers malades à la Jamaïque [9] et en Floride, lesquels présentent des symptômes assez voisins de ceux manifestés par les cocotiers atteints de la maladie de Kaincopé. D'autre part, l'existence de maladies de plantes, liées au sol et à des mycoplasmes vient d'être démontrée [3]. C'est pourquoi nous avons envisagé d'explorer cette voie de recherches.

## ETIOLOGICAL RESEARCH

The area in which this disease appears is characterized by sandy-type soils. Soil analyses by Lamouroux [6] have not brought to light any significant difference between healthy and diseased zones. In the same way, analyses by Bachy and Hoestra [1] of the tissues of healthy and sick plants has shown no significant difference. Fertilizer tests carried out by the same authors were also inconclusive. On the other hand they note that the development of the disease is periodical, which allows it to be thought that a living organism, causal or vector and submitted to the seasonal cycle, is concerned.

The only reliable indication being that the disease is propagated through the soil, two different paths were explored.

The first was a possible relationship with *Fusarium*, many of them being closely associated with soil conditions and certain of them provoking tracheomycoses which lead to more or less rapid wilting. However, research by Meiffren [8] has not enabled any etiological conclusion to be drawn in this connection.

The second concerns a possible link between the disease and nematodes. Work by Luc [7] has led to the discovery of three phytoparasitic nematodes present in coconut plantations. But their more or less permanent association with Kaincope disease zones is not conclusive.

Recently, research has started again under a double impetus. Firstly, mycoplasma have been found in diseased coconut palms in Jamaica [9] and Florida, where the trees manifest symptoms fairly closely resembling those of coconuts with Kaincope disease. Secondly, the existence of plant diseases connected with the soil and with mycoplasma has just been proved [3]. This is why we decided to explore this line of research.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel botanique provient d'une part de cocotiers situés en zone malade et présentant les signes évidents de maladie, et d'autre part de cocotiers ayant un aspect sain et se trouvant en dehors des secteurs où se manifeste la maladie. Les échantillons prélevés sont des extrémités de racines ou de jeunes inflorescences. Les essais portent sur des envois reçus au laboratoire en décembre 1973, mars 1974, octobre 1974. Les échantillons sont conservés à 4 °C pendant une à deux semaines. Chacun d'eux fait l'objet pendant ce délai de deux ou trois séries de mises en culture. Outre les témoins cocotiers supposés sains, on procède à des essais, d'une part avec des plants de *V. rosea* atteints de maladies connues, à partir desquelles des cultures de mycoplasmes sont obtenues couramment telles que la phyllodie 1 et le stolbur C, et d'autre part avec des plantes saines.

Les milieux utilisés sont les MII71U et MI71U dont la composition a déjà été donnée [4]. Pour les mises en culture, les fragments de végétaux sont d'abord désinfectés à l'alcool à 90° pendant 2 mn puis à l'hypochlorite de Ca à 5 p. 100 pendant 10 mn, et enfin lavés à l'eau distillée stérile courante pendant 20 à 30 mn. Ils sont ensuite découpés plus ou moins finement dans 10 ml de milieu stérile. L'opération suivante consiste en une filtration, à travers une membrane stérile de 450 nm disposée dans un appareil swinnex placé sur un petit flacon, l'ensemble étant stérile. L'incubation a lieu à la température de 30-32 °C.

## RÉSULTATS

**Primocultures.** Elles se développent en 12 à 15 jours à partir des seuls échantillons provenant de plantes malades. Les milieux liquides, de couleur rouge au pH de départ de 7,6 (grâce à du rouge de phénol) deviennent jaune. Les seuls micro-organismes qui apparaissent présentent les caractères des germes mycoplasmatiques : petite taille (0,5 nm de diamètre), ovoïdes ou ronds pendant la phase de multiplication rapide.

Selon les envois, les résultats varient légèrement. Les deux premiers ne comprennent que des racines et tous les échantillons correspondant aux plantes malades donnent lieu à des cultures. Les deux suivants comprennent des racines et des inflorescences. Dans un cas correspondant à un même cocotier, les cultures sont positives avec les inflorescences et négatives avec les racines.

**Subcultures.** En milieux liquides, les repiquages évoluent en deux jours environ. En milieux gélifiés apparaissent des colonies caractéristiques, en « œuf sur le plat ». Après congélation à la température de — 20 à — 30 °C, les mycoplasmes reprennent leur multiplication. L'analyse biochimique et sérologique de ces germes est ainsi facilitée.

Les premiers résultats obtenus sur ces bases permettent de penser que les cultures obtenues à partir des cocotiers malades sont toutes identiques entre elles et ne correspondent pas aux mycoplasmes culti-

## MATERIAL AND METHODS

*The botanic material comes partly from coconuts growing in disease zones and bearing obvious signs of the disease, and partly from healthy-looking coconuts lying outside the sectors where the disease is found. Samples are taken from the tips of roots or young inflorescences. Tests were done on consignments received in the laboratory in December 1973, March 1974 and October 1974. The samples are stored at 4 °C for one or two weeks, during which time two or three series of cultures are started. Apart from the controls which are presumed healthy, tests are also made with *V. rosea*, attacked by known diseases, from which cultures of mycoplasma such as Phyllody 1 and Stolbur C are currently obtained, as well as with healthy plants.*

*The media used are MII71U and MI71U, the composition of which has already been given [4]. For culturing, the plant fragments are first disinfected in 90° alcohol for 2 mn, then in calcium hypochlorite at 5 p. 100 for 10 mn, and finally washed in running, distilled, sterile water for 20-30 mn. They are then chopped fairly fine in 10 ml. of sterile medium. The next operation consists in filtering through a 450 nm. sterile membrane in a Swinnex apparatus placed on a small flask, the whole being sterile. Incubation takes place at a temperature of 30-32 °C.*

## RESULTS

**Primocultures :** *they develop in 12-15 days on the samples from diseased plants only. The liquid media, red in colour and with an initial pH of 7.6 (due to phenol red), become yellow. The only micro-organism which appear have the characters of mycoplasmic germs : small size (0.5 nm. in diameter), ovoid or round during the rapid multiplication phase.*

*The results vary slightly from one consignment to another. The first two contained only roots, and all the samples from diseased plants gave rise to cultures. The next two contained roots and inflorescences. In one case, the cultures were positive for the inflorescences and negative for the roots in samples from the same coconut palm.*

**Sub-cultures :** *in liquid media, re-seedings evolve in about two days. In gelled media typical colonies in a « fried egg » pattern appear. After freezing to — 20 to — 30 °C, the mycoplasmas start multiplying again. The biochemical and serological analysis of these germs is thus facilitated.*

*The first results obtained on these bases indicate that the cultures obtained from diseased coconuts are identical and do not correspond to the mycoplasmas cultured*



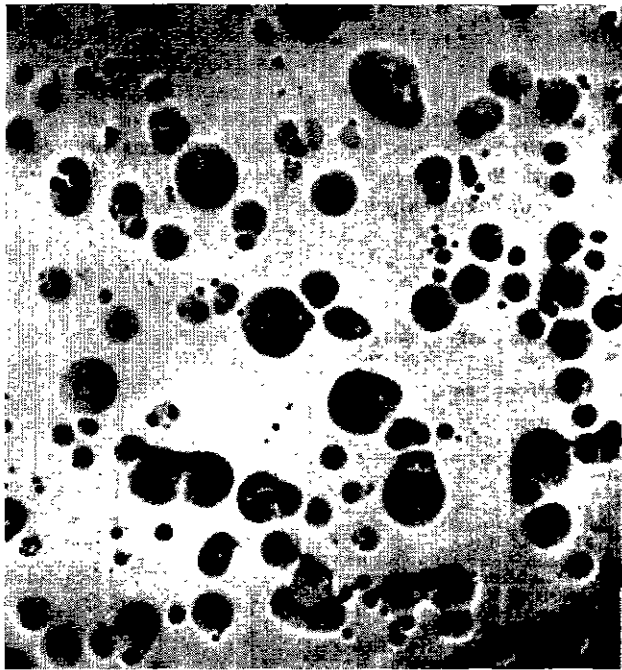


Fig. 3. — Colonies de mycoplasmes en œuf sur le plat en milieu solide ( $\times 35$ ).

Fig. 3. — *Egg fried mycoplasma colonies on solid media ( $\times 35$ ).*

vés à partir des plantes atteintes de phyllodie 1 ou de stolbur C, ni à d'autres mycoplasmes cultivés couramment dans notre laboratoire à partir de plantes atteintes de différentes maladies.

## DISCUSSION

L'étude expérimentale de la maladie de Kaincopé comme du Lethal Yellowing et des maladies similaires est rendue difficile du fait que la technique du greffage n'est pas applicable, que l'on ne connaît pas de cuscutes parasites de ces plantes, et qu'aucun vecteur de ces maladies n'est actuellement reconnu.

La mise en évidence des mycoplasmes dans les cocotiers malades ouvre la voie à une série de travaux ayant des applications pratiques immédiates. Sur le plan de la localisation des germes, des examens histochemiques de racines de cocotiers malades permettent de noter au voisinage des apex, des cellules libériennes riches en matériel Feulgen positif. Il est très vraisemblable que cette réaction est due à la présence de germes mycoplasmatiques. Leur responsabilité peut être dans un premier temps étudiée par le moyen d'antibiotiques. Dès maintenant, il est possible de rechercher insectes, arthropodes ou invertébrés piqueurs-suceurs, peu mobiles, susceptibles d'être porteurs de germes, par le moyen de la mise en culture des mycoplasmes. Cette méthode, déjà appliquée notamment dans le cas de la maladie de Parakou liée au sol, a permis de suspecter le rôle vecteur de *Margarodites* souterrains. D'un autre côté, l'étude biochimique et sérologique précise des mycoplasmes actuellement cultivés permettra de préciser leur aire de répartition au Togo et dans les pays voisins et leur relation avec ceux liés à d'autres maladies du cocotier dont il serait important

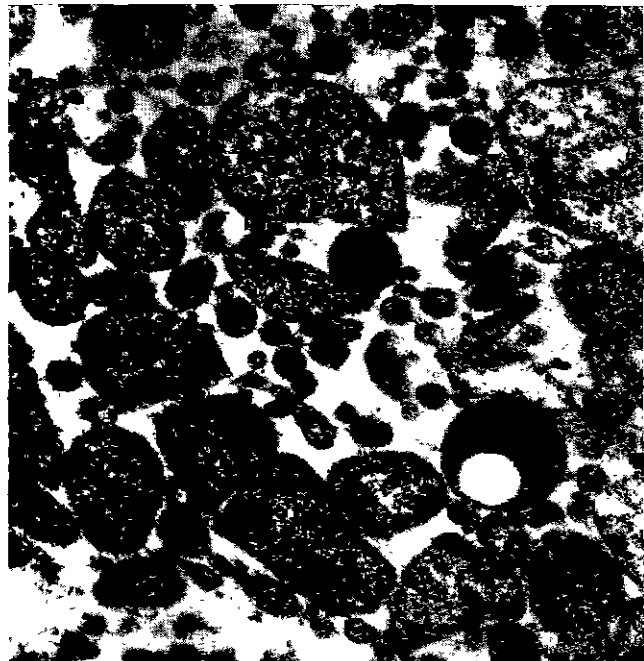


Fig. 4. — Coupe d'une colonie de mycoplasmes examinée au microscope électronique ( $\times 15\ 000$ ). M : mycoplasme.

Fig. 4. — *Section in a colony of mycoplasmas examined by electron microscopy ( $\times 15\ 000$ ). M : mycoplasma.*

from plants attacked by *Phyllody 1* or *Stolbur C*, or to other mycoplasmas currently cultured in our laboratory from plants infected with different diseases.

## DISCUSSION

The experimental study of *Kaincope* disease, as of *Lethal Yellowing* and similar diseases, is made difficult by the fact that the grafting method cannot be applied, that no *Cuscuta* parasiting these plants are known and that no vector has as yet been found for these diseases.

The discovery of mycoplasmas in the diseased coconuts opens the way for a series of research with immediate practical application. From the point of view of localization of the germs, the histochemical examinations of the roots of diseased coconuts reveal phloem cells rich in positive Feulgen material close to the apex. It is very probable that this reaction is due to the presence of mycoplasmic germs. For a start, their responsibility in the disease can be studied by means of antibiotics. As of now, it is possible to look for insects, Arthropoda or invertebrate stinging-suckers, not very mobile, who are likely to be carriers of the germs. This method, already applied in particular in the case of *Parakou* disease linked with the soil, led to the vector role of subterranean *Margarodites* being suspected. From another angle, the precise biological and serological study of the mycoplasmas now being cultured will enable their area of distribution in Togo and neighbouring countries, as well as their relationship with those associated with other coconut diseases which it would be important to try and

de tenter la mise en culture. Enfin, comme les premiers cas de maladie ne sont apparus qu'à douze ans sur les cocotiers Nains, qu'un seul cas est signalé sur les hybrides Nains × Grand Ouest Africain au même âge, et que le Grand de Malaisie ne présente encore aucun cas à 14 ans [Brunin et Renard, 2], il paraît nécessaire d'observer le comportement de ces variétés parallèlement à leur capacité à résister à l'infection.

*culture, to be defined. Finally, as the first cases of disease did not appear until their twelfth year on Dwarf coconuts, since only one case is recorded on Dwarf × West African Tall hybrids at the same age, and since the Malayan Tall has presented no case at all at 14 years [Brunin & Renard 2], it would appear necessary to observe the performance of these varieties at the same time as their capacity to resist the infection.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BACHY A. et HOESTRA H. — Contribution à l'étude de la « maladie de Kaïncopé » du cocotier au Togo. *Oléagineux*, 1958, 13, 721-729.
- [2] BRUNIN J. et RENARD J. L. — Rapports de mission (20 mai 1974). Non publié.
- [3] DELATTRE R., GIANNOTTI J. et CZARNECKY D. — Maladies du cotonnier et de la vigne liées au sol et associées à des cochenilles endogées. Présence de mycoplasmes et étude comparative des souches *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. Paris, D*, 1974, 279, 315-318.
- [4] GIANNOTTI J. — La culture *in vitro* des mycoplasmes de plantes et leur transmission par des vecteurs. *Meded. Fak. Landbouwwetenschappen*, 1972, 37, 429-440.
- [5] GIANNOTTI J. et DELATTRE R. — Une nouvelle approche de l'étude épidémiologique d'une phyllostictie, la virescence florale du cotonnier : culture sélective de mycoplasmes extraits de quelques plantes et insectes homoptères de la biocénose. *Coton Fibres trop.*, 1972, 27, 371-377.
- [6] LAMOUREUX M. — Les sols de la bande côtière du Sud-Togo en relation avec la maladie de Kaïncopé. Institut de Recherches du Togo, Lomé, 1958. *Rapport ORSTOM*.
- [7] LUC M. — Nématodes et maladie de Kaïncopé du cocotier. *Oléagineux*, 1957, 12, 691-693.
- [8] MEIFFREN M. — Note préliminaire sur l'étude de la maladie des cocotiers au Togo. *Agron. trop.*, 1951, 6, 163-174.
- [9] PLAVSIC-BANJAC BILJANA, HUNT P. et MARAMOROSCH K. — Mycoplasma-like bodies associated with Lethal Yellowing disease of coconut palms. *Phytopathologist*, 1972, 62, 298-299.

## RESUMEN

**Puesta en cultivo de micoplasmas a partir de raíces y de inflorescencias de cocoteros atacados por la enfermedad de Kaïncopé.**

J. GIANNOTTI, F. ARNAUD, M. DOLLET, R. DELATTRE y G. de TAFFIN, *Oléagineux*, 1975, v. 30, N° 1, p. 13-18.

En 1932 en Kaïncopé (Togo), apareció en el cocotero una enfermedad que se propaga lentamente, en forma de mancha de aceite. Los árboles con ataque mueren de 3 a 7 meses después de la aparición de los primeros síntomas. El modo de propagación de la enfermedad deja suponer que el agente causal o vector está relacionado con el suelo.

El estudio de los cultivos realizado a partir de las extremidades de raíces o de inflorescencias jóvenes procedentes de árboles enfermos o de árboles sanos tomados en una zona sana demostraron que existía unas partículas de tipo micoplasma. Unas nuevas investigaciones de carácter práctico han sido previstas : localización de los gérmenes, tratamiento con antibióticos, determinación de los vectores, zona de extensión del micoplasma, prueba de resistencia de diferentes tipos de cocotero.

